



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 40 13 142 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 40 13 142.4  
㉔ Anmeldetag: 25. 4. 90  
㉓ Offenlegungstag: 31. 10. 91

⑤1 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 12 N 9/54**  
C 12 N 9/28  
C 12 N 9/92  
C 12 N 9/20  
C 12 N 9/96  
// C 12N 9/56, C 12Q  
1/37, 1/40, 1/533, B 01J  
39/06, 41/06, 2/04,  
C 11D 3/386, C 12S  
11/00, C 13K 1/06

DE 40 13 142 A 1

⑦1 Anmelder:  
Solvay Enzymes GmbH & Co KG, 3070 Nienburg, DE

⑦2 Erfinder:  
Geyer, Hans-Ulrich, Dr., 3000 Hannover, DE;  
Konieczny-Janda, Gerhard, 3017 Pattensen, DE

⑤4 Verfahren zur gezielten Veränderung der Eigenschaften von Enzymen durch chemische Modifizierung und chemisch modifizierte Enzyme

⑤7 Beschrieben wird ein Verfahren zur gezielten Veränderung der Eigenschaften von Enzymen durch chemische Modifizierung. Ferner werden neue, chemisch modifizierte Enzyme, die Herstellung derselben sowie deren Verwendung beschrieben.

DE 40 13 142 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur gezielten Veränderung der Eigenschaften von Enzymen durch chemische Modifizierung derselben, auf die Herstellung chemisch modifizierter Enzyme sowie auf die chemisch modifizierten Enzyme und deren Verwendung.

In Stand der Technik ist es bereits bekannt, zur Veränderung und zur Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften von Enzymen — wie z. B. Adenosindeaminase, Asparaginase, Urikase, Superoxiddismutase, Katalase — diese durch Umsetzung mit Polyethylenglykol zu modifizieren. Die europäische Patentanmeldung 1 54 316 beschreibt weiterhin die Umsetzung von Lymphokinin mit Monoalkylenglykolaldehyden. Aus der europäischen Patentanmeldung 1 28 975 ist es bekannt, wasserlösliche biologisch aktive Konjugate durch Kuppelung von Proteinen, z. B. Enzymen, mit Alkylenglykolestern einer Polyuronsäure unter alkalischen Bedingungen herzustellen. Hierbei ist die Polyuronsäure durch Amidbindungen an das Protein und durch Esterbindungen an den Alkylenglykolrest gebunden. Aus der deutschen Offenlegungsschrift 29 19 622 sind wasserlösliche stabilisierte Enzymderivate, insbesondere Proteasederivate, bekannt, die durch Umsetzung des Enzyms mit Aldehydgruppen-haltigen Polysaccharidderivaten, z. B. Dialdehydstärke oder Dialdehydcellulose, zu einem immobilisierten, d. h. unlöslichen Enzymprodukt und nachfolgende Reduktion des immobilisierten Enzymproduktes mit komplexen Hydriden erhalten wurden. Hierbei müssen mindestens zwei der verfügbaren Aminogruppen des Enzymanteils sowie mindestens zwei der verfügbaren Aldehydgruppen des Polysaccharidanteils miteinander vernetzt und das derart erhaltene Produkt zusätzlich hydriert werden.

Ferner wurde im Stand der Technik bereits Subtilisin nitrirt, carbamylt, glutarylisiert und succinylt, um die Effekte dieser chemischen Modifizierungen auf die enzymatische Aktivität zu untersuchen. Auch  $\alpha$ -Amylasen wurden bereits mit organischen Säureanhydriden — wie z. B. Essigsäure-, Propionsäure-, Buttersäureanhydrid etc. — zur korrespondierenden acylderivatisierten  $\alpha$ -Amylase modifiziert. Chymotrypsinogen wurde ebenfalls mit Säureanhydriden, wie z. B. Essigsäure- oder Succinsäureanhydrid, in acylierte Derivate und beispielsweise mit Ethylendiamin auch in amidierete Derivate überführt. Weiterhin ist die Umsetzung von Glucoseisomerase bzw. D-Xyloseisomerase mit Diethylpyrocarbonat sowie von Glucoseisomerase mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure bekannt.

Die im Stand der Technik bekannten Verfahren zur chemischen Modifizierung von Enzymen beschränken sich in ihrer Anwendbarkeit jeweils nur auf spezielle Enzyme und Arten der chemischen Modifizierung bezüglich der in das Enzym einföhrbaren Reste. Darüber hinaus lassen die bekannten Verfahren nur einen geringen Spielraum hinsichtlich der Art und Weise, sowie hinsichtlich einer abgestuften Durchführbarkeit der chemischen Modifizierung von Enzymen zu. Die zur Modifizierung der Enzyme im Stand der Technik eingesetzten Reagenzien (z. B. für die Nitrirung) sind oft zu aggressiv oder die in diesen Reagenzien enthaltenen funktionellen Gruppen (wie z. B. Aldehydgruppen oder Säureanhydridgruppen) die zur Anbindung der Modifizierungsreagenzien an das Enzym dienen, sind chemisch zu reaktiv und erschweren dadurch die gezielte Steuerung des Modifizierungsgrades. Oder sie sind sogar an sich mit den Enzymen schlecht verträglich. Die chemische Modifizierung von Enzymen ist im Stand der Technik nach Art und Grad der Modifizierung somit schwer steuerbar. Die gebildeten Bindungstypen zwischen Enzym und Modifizierungsreagenz können sich darüber hinaus (wie z. B. Imin-, Ester- oder Amidbindungen) als zu wenig hydrolysestabil erweisen und dadurch die Anwendung der modifizierten Enzyme einschränken.

Es bestand daher die Aufgabe, ein einfaches, mildes und zugleich vielseitiges Verfahren zur gezielten Veränderung der Eigenschaften von Enzymen durch Derivatisierung und zur chemischen Modifizierung von Enzymen zur Verfügung zu stellen, welches auf eine Vielzahl von Enzymen anwendbar ist. Dieses Verfahren sollte hinsichtlich Art und Grad der Modifizierung der Enzyme leicht steuerbar sein und somit ein maßgeschneidertes Anpassen von Enzymen für bestimmte Anforderungen ermöglichen. Eine weitere Aufgabe bestand in der Bereitstellung neuer, wertvoller, durch chemische Modifizierung optimierter Enzymderivate für verschiedene Anwendungszwecke.

Die Aufgaben werden gelöst durch die erfindungsgemäßen Verfahren, die erfindungsgemäß chemisch modifizierten Enzyme (Enzymderivate) und deren Verwendung.

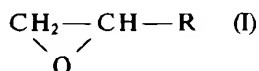
Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur gezielten Veränderung der Eigenschaften eines Enzyms durch chemische Modifizierung, welches sich dadurch auszeichnet, daß man das Enzym durch Umsetzung mit einer, endständigen Epoxid- oder Halogenhydrinverbindung, die einen die biochemischen und anwendungstechnischen Eigenschaften des Enzyms gezielt verändernden, kationischen, amphiphilen, anionischen und/oder lipophilen bzw. hydrophoben organischen Rest enthält, in ein wasserlösliches bzw. nicht wasserunlösliches, chemisch modifiziertes Enzym (Enzymderivat) überführt.

Die erfindungsgemäß zur chemischen Modifizierung von Enzymen eingesetzten Modifizierungsreagenzien enthalten als reaktive Gruppe eine endständige Epoxid- oder als deren Vorstufe eine Halogenhydringruppe. Diese Epoxid- bzw. Halogenhydringruppe ist eine milde, chemische reaktive Gruppe, die bevorzugt mit freien basischen Gruppen des zu modifizierenden Enzyms reagiert. Solche basischen Gruppen im zu modifizierenden Enzym sind bevorzugt freie, primäre Aminogruppen von polyfunktionellen Aminosäuren, die in der das Enzym aufbauenden Polypeptidkette enthalten und durch ihre Lage an der Enzymoberfläche für das Reagenz zugänglich sind. Es handelt sich dabei insbesondere z. B. um die  $\epsilon$ -Aminogruppe der Aminosäure Lysin oder gegebenenfalls auch um die Aminofunktion in der Guanidiniumgruppe der Aminosäure Arginin. Die Basizität bzw. Nukleophilie dieser Aminogruppen ist günstig auf die Reaktivität der eingesetzten Epoxid- bzw. Halogenhydrin-Verbindungen abgestimmt und der Modifizierungsgrad läßt sich daher leicht durch Einstellung der Reaktionsparameter pH-Wert, Temperatur und Reaktionszeit steuern. Darüber hinaus sind die erfindungsgemäß eingesetzten Epoxide bzw. Halogenhydrine billig und in großen Mengen technisch herstellbar und somit gut verfügbar. Eine Vielzahl dieser Epoxide ist auch kommerziell erhältlich. Neben der für die Anbindung an das Enzym erfindungs-

gemäß wichtigen endständigen Epoxid- bzw. Halogenhydringruppe können die Epoxide ihrer Art nach eine Vielzahl von Resten tragen, die durch ihre jeweiligen spezifischen Eigenschaften die Eigenschaften der erhaltenen Enzymderivate modifizieren und dadurch die gezielte Variation der biochemischen und anwendungstechnischen Eigenschaften dieser Enzymderivate ermöglichen.

Durch die Erfindung wird auch ein Verfahren zur Herstellung wasserlöslicher bzw. nicht wasserunlöslicher, chemisch modifizierter Enzyme (Enzymderivate) bereit gestellt, welches sich dadurch auszeichnet, daß man durch unter basischen Bedingungen erfolgende Umsetzung wenigstens einer der nicht im Aktivitätszentrum befindlichen, freien primären Aminogruppen eines Enzyms mit

a) Epoxiden der Formel I

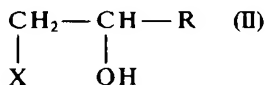


worin

R für einen kationischen, amphiphilen, anionischen oder lipophilen bzw. hydrophoben organischen Rest steht,

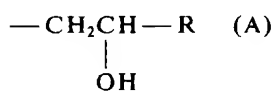
oder mit

b) Halogenhydrinen der Formel II



worin

X für Halogen, vorzugsweise Chlor oder Brom, steht und R die obige Bedeutung besitzt, das Enzym in ein wasserlösliches bzw. nicht wasserunlösliches, chemisch modifiziertes Enzym (Enzymderivat) überführt, worin eine oder mehrere der genannten freien Aminogruppen des Enzyms mit einem Rest der Formel A



worin R die obige Bedeutung besitzt, substituiert sind.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren zur chemischen Modifizierung von Enzymen wird die Molekülgröße der eingesetzten Enzyme kaum verändert. Die Wasserlöslichkeit, die hier insbesondere als die Löslichkeit in einem Wasser enthaltenden Anwendungsmedium angesehen wird, der eingesetzten Enzyme wird daher durch die erfindungsgemäße chemische Modifizierung kaum beeinträchtigt. Es werden somit wasserlösliche bzw. nicht wasserunlösliche, d. h. insbesondere in Wasser enthaltenden Anwendungsmedien lösliche bzw. nicht unlösliche, chemisch modifizierte Enzymderivate erhalten, deren Wasserlöslichkeit im wesentlichen derjenigen der zugrundeliegenden Enzyme entspricht bzw. demgegenüber gegebenenfalls allenfalls soweit vermindert ist, daß sie nicht vollständig wasserunlöslich sind. Die Begriffe "wasserlöslich" bzw. "Wasserlöslichkeit" umfaßt hier auch feine Dispersionen, wie insbesondere Emulsionen.

Bei der Durchführung des vorstehend genannten Verfahrens zur Herstellung chemisch modifizierter Enzymderivate kann von in beliebiger Form vorliegenden Enzymen ausgegangen werden. Das Verfahren ist unabhängig von der Vorgeschichte, z. B. den Fermentations- und Isolierungsbedingungen, des Enzyms. Es kann sowohl von festen sprühgetrockneten, kristallisierten, granulierten Enzymen oder auch von Enzymlösungen bzw. -konzentraten beliebiger Konzentration ausgegangen werden. Hierbei erweist es sich als vorteilhaft, daß auch von Zwischenstufen, d. h. von Lösungen oder Konzentraten von Enzymen, einer normalen Enzymproduktion ausgegangen werden kann.

Die Umsetzung wird gewöhnlich in Lösung, vorzugsweise in einer wäßrigen Lösung, durchgeführt. Die Reaktionslösungen können gegebenenfalls enzymverträgliche organische Lösungsmittel, z. B. Alkohole, Diöle etc., oder Enzymstabilisatoren enthalten. Feste Enzym-Ausgangsstoffe werden daher in der gewünschten Konzentration in Wasser oder im Wasser/Lösungsmittelgemisch gelöst. Geht man direkt von Enzymlösungen aus einer normalen Enzymproduktion aus, so können diese in der anfallenden Konzentration oder nach Konzentrierung auf jeweils gewünschte Konzentrationen eingesetzt werden. In einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung chemisch modifizierter Enzymderivate werden jedoch wäßrige Enzymkonzentrate eingesetzt, die 10 bis 35 Gew.-% Trockensubstanzgehalt aufweisen. In einer weiteren Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann es sich als zweckmäßig erweisen, die Umsetzung in Gegenwart von Enzymstabilisatoren und/oder Lösungsvermittlern durchzuführen. Vorzugsweise wird die Reaktion dann in Gegenwart von Propandiol ausgeführt, welches dabei durchaus in Mengen bis zu etwa 84 Gew.-% (bezogen auf das gesamte Reaktionsgemisch) anwesend sein kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung chemisch modifizierter Enzyme (Enzymderivate) wird

unter basischen Bedingungen ausgeführt. Hierunter wird verstanden, daß die Umsetzung bei pH-Werten von oberhalb 7 durchgeführt wird. In einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Herstellverfahrens wird die Umsetzung bei pH-Werten von 9 bis 11 durchgeführt. Die Reaktion kann dabei sowohl bei einem hohen Anfangs pH-Wert begonnen werden, der sich im Laufe der Reaktion allmählich zu kleineren alkalischen pH-Werten (bis maximal hinab zu pH 7) verschiebt oder durch laufende Nachregulation des pH-Wertes auf einem konstanten alkalischen pH-Wert gehalten werden. Die pH-Wert-Einstellung kann hierbei durch alle an sich mit Enzymen verträglichen anorganischen Basen, wie z. B. insbesondere Alkalioxiden oder -hydroxiden, vorgenommen werden. Bevorzugt wird Natriumhydroxid, insbesondere in Form von wäßriger Lösung (Natronlauge) zur pH-Wert-Einstellung verwendet.

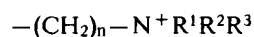
Die Temperatur des Verfahrens wird nur durch die Temperaturstabilität der eingesetzten Enzyme nach oben hin begrenzt. Die Umsetzung erfolgt in zweckmäßigen Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Herstellverfahrens daher bei Temperaturen bis maximal 35°C. Vorzugsweise wird die Umsetzung aber bei Temperaturen von bis zu maximal 30°C durchgeführt. Nach unten hin wird die Reaktionstemperatur in der Regel durch Umgebungstemperaturen von etwa 25°C begrenzt, da unterhalb dieser Temperaturen keine bzw. nur unzureichende Umsetzungen zu beobachten sind.

Die Reaktionszeit kann je nach Art des modifizierenden Enzyms und je nach Art des gewählten Modifizierungsreagenzes und des gewünschten Modifizierungsgrades von wenigen Stunden bis hin zu einem ganzen Tag betragen. In der Regel werden in zweckmäßigen Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Herstellverfahrens Reaktionszeiten von 1 bis 8 Stunden gewählt. Der Modifizierungsgrad der erhaltenen erfindungsgemäßen Enzymderivate kann hierbei in einem weiten Bereich von gering, über mittel und mittelstark bis hin zu stark eingestellt werden. Anstelle länger andauernder Reaktionszeiten kann es gegebenenfalls je nach eingesetzten Enzym auch zweckmäßig sein, die Reaktionszeit durch Einsatz eines Überschusses an Modifizierungsreagenz zu verkürzen, was nicht nur aus verfahrenstechnischer Sicht, sondern auch aus wirtschaftlicher Sicht von Vorteil ist (höherer Wert der Enzyme; billige und in großer Menge gut verfügbare Modifizierungsreagenzien). In zweckmäßigen Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Herstellverfahrens wird daher in der Regel mit einem 5- bis 10fachen Überschuß an Modifizierungsreagenz (bezogen auf die im zu modifizierenden Enzym enthaltenen freien, substituierbaren Aminogruppen) gearbeitet. Gewünschtenfalls kann es zur Erzielung höherer Modifizierungsgrade auch erwünscht sein, mit noch einem höheren Überschuß an Modifizierungsreagenz zu arbeiten. Die Zugabe des Modifizierungsreagenzes zur Lösung des zu modifizierenden Enzyms kann sowohl kontinuierlich als auch in mehreren Dosen über die Reaktionszeit verteilt werden oder auch nur einmalig zu Beginn der Umsetzung des zu modifizierenden Enzyms vorgenommen werden. Die einmalige Zugabe zu Beginn der Reaktion führt hierbei zu höheren Reaktionsgeschwindigkeiten und auch zu höheren Modifizierungsgraden und ist somit insbesondere dann zweckmäßig, wenn kurze Reaktionszeiten oder insgesamt höhere Modifizierungsgrade erzielt werden sollen.

Zur Beendigung der Reaktion wird das Reaktionsgemisch im allgemeinen auf 20°C abgekühlt und mit einer wäßrigen Lösung einer enzymverträglichen anorganischen und/oder organischen Säure auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Beispielhaft sei hierfür eine wäßrige Lösung von Zitronensäure genannt. Die erhaltenen Reaktionsgemische können entweder als solche einer weiteren Verwendung zugeführt werden oder aber in an sich üblicher Weise, wie bei einer normalen Enzym-Herstellung/-Konfektionierung, üblichen Maßnahmen unterworfen werden. So können die das erfindungsgemäße Enzymderivat enthaltenden Gemische mit an sich üblichen Enzymstabilisatoren versetzt, zu Konzentraten aufgearbeitet oder in an sich üblicher Weise, z. B. durch Sprühtrocknung, in ein festes Produkt überführt und auch granuliert werden.

Durch die Erfindung wird ein chemisch sehr mildes und enzymeschonendes Verfahren zur gezielten chemischen Veränderung der Eigenschaften eines Enzyms mittels chemischer Modifizierung bereitgestellt, welches sich hervorragend zur Herstellung von chemisch modifizierten Enzymen eignet. Die durch das Verfahren erhaltenen erfindungsgemäßen Enzymderivate können chemisch modifizierte Enzyme sein, deren zugrundeliegenden Enzyme durch Substitution mit unterschiedlichsten Arten von organischen Resten in ihren Eigenschaften chemisch modifiziert sein können. So können die mit dem Epoxid der Formel I oder dem Halogenhydrin der Formel II in das Enzym eingeführten organischen Reste R kationisch, amphiphil, anionisch oder hydrophob sein. Hierdurch lassen sich die Eigenschaften eines Enzyms zielgerichtet in vielfältigster Weise verändern. Z. B. können die isoelektrischen Punkte, die pH-Optima, die Oberflächeneigenschaften (Ladung, Hydrophobie), die Grenzflächenaktivität etc. gezielt beeinflußt werden.

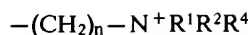
In einer Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung von wasserlöslichen, chemisch modifizierten Enzymen werden zur chemischen Modifizierung des zugrundeliegenden Enzyms Epoxide der Formel I oder Halogenhydrine der Formel II eingesetzt, in denen R für einen kationischen organischen Rest der Formel



steht, worin R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und/oder R<sup>3</sup> für einen Niedrigalkylrest mit 1 bis 2 C-Atomen, vorzugsweise für Methyl, stehen und n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet. Man erhält so chemisch modifizierte Enzymderivate, die aufgrund der kationischen Reste R eine erhöhte positive Oberflächenladung besitzen. In dieser Variante des erfindungsgemäßen Herstellverfahrens sind die Reste R dann z. B. Trimethylammoniummethylen-, Trimethylammoniummethylen-, Trimethylammoniumtrimethylen-Gruppen, wobei die Trimethylammoniummethylen-Gruppe ganz besonders bevorzugt ist. Ein Beispiel für ein in dieser Variante eingesetztes Modifizierungsreagenz ist z. B. das 2,3-Epoxypropyltrimethylammoniumchlorid.

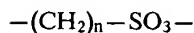
In einer anderen Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung von wasserlöslichen, chemisch modifizierten Enzymen werden zur chemischen Modifizierung des zugrundeliegenden Enzyms Epoxide der Formel I oder Halogenhydrine der Formel II eingesetzt, in denen R für einen amphiphilen organischen Rest der

Formel



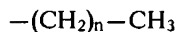
steht, worin  $R^1$  und/oder  $R^2$  für einen Niedrigalkylrest mit 1 bis 2 C-Atomen, vorzugsweise für Methyl, stehen,  $R^4$  für einen geradkettigen C10- bis C18-Alkylrest steht und n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet. Man erhält so chemisch modifizierte Enzyme, deren amphiphilen Reste R neben der positiven Ammoniumgruppe auch einen hydrophoben substituierten  $R^4$  enthalten. Beispiele für in dieser Variante eingesetzte Modifizierungsreagenzien sind z. B. 3-Chloro-2-hydroxypropyl-dimethylaurylammoniumchlorid und 3-Chloro-2-hydroxypropyldimethylcoco(C12—C16)ammoniumchlorid.

In einer weiteren Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung von wasserlöslichen, chemisch modifizierten Enzymderivaten werden zur chemischen Modifizierung des zugrundeliegenden Enzyms Epoxide der Formel I oder Halogenhydrine der Formel II eingesetzt, in denen R für einen anionischen organischen Rest der Formel



steht, worin n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet. Man erhält so chemisch modifizierte Enzyme, die aufgrund der anionischen Reste R eine erhöhte negative Oberflächenladung besitzen. Als chemische Modifizierungsreagenzien werden in dieser Variante des erfindungsgemäßen Herstellverfahrens dann beispielsweise 2-Chloro-1-hydroxyethyl-alkylensulfonate, vorzugsweise in Form des Natriumsalzes, eingesetzt. Für diese Variante ganz besonders bevorzugte chemische Modifizierungsreagenzien sind z. B. die 3-Chloro-2-hydroxypropylsulfonate, insbesondere das Natriumsalz.

In einer weiteren anderen Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung von wasserlöslichen chemisch modifizierten Enzymen werden zur chemischen Modifizierung des zugrundeliegenden Enzyms Epoxide der Formel I oder Halogenhydrine der Formel II eingesetzt, in denen R für einen hydrophoben organischen Rest der Formel

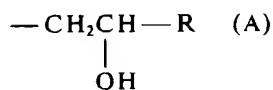


steht, worin n eine ganze Zahl von 1 bis 17 bedeutet. Man erhält so chemisch modifizierte Enzyme, die aufgrund der hydrophoben Reste R eine erhöhte Hydrophobie besitzen. In einer zweckmäßigen Ausgestaltung dieser Variante des erfindungsgemäßen Herstellverfahrens wird die Reaktion unter Einsatz von Enzymkonzentraten, insbesondere mit sehr hohen Enzymkonzentrationen, und unter Verwendung von Lösungsvermittlern, vorzugsweise von Propandiol, durchgeführt. Als chemische Modifizierungsreagenzien lassen sich in dieser Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens insbesondere die Epoxide von 1-Alkenen einsetzen. Beispiele hierfür sind z. B.  $\alpha$ -Epoxide wie Hexen-1-oxid, Octen-1-oxid, Decen-1-oxid, Dodecen-1-oxid, Tetradecen-1-oxid, Hecadecen-1-oxid, Oktadecen-1-oxid.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von wasserlöslichen, chemisch modifizierten Enzymderivaten können an sich beliebige Enzyme, insbesondere solche mit großtechnischer Bedeutung für verschiedene Anwendungen wie z. B. Waschmittelenzyme, Enzyme zur Stärkeverzuckerung und andere Anwendungen, eingesetzt werden. In einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Herstellverfahrens werden als Enzyme insbesondere Proteasen, Amylasen, Glucoseisomerasen oder Lipasen eingesetzt. Es können aber auch andere Enzyme wie z. B. Pectinasen, Cellulasen oder Hemicellulasen etc. verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von wasserlöslichen, chemisch modifizierten Enzymderivaten erlaubt ein gezieltes, chemisch sehr mildes Maßschneiden von Enzymderivaten mit an den jeweiligen Anwendungszweck in gewünschter Weise angepaßten Eigenschaften. So ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren in einfacher Weise, z. B. die Oberflächeneigenschaften hinsichtlich Ladung und Hydrophobie in gewünschter Weise zu variieren. Enzymeigenschaften wie z. B. pH-Optimum, pH-Stabilität, Temperaturoptimum, Temperaturstabilität, Oxidationsstabilität oder Kompatibilität mit anderen Enzymen (z. B. Stabilität gegen Verdauung durch gegebenenfalls anwesende Protease), Grenzflächenaktivität etc. lassen sich so leicht verändern und auf das jeweilige technische Einsatzgebiet der Enzyme in gewünschter Weise einstellen.

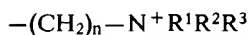
Die Erfindung betrifft daher auch solche wasserlöslichen bzw. nicht wasserunlöslichen, chemisch modifizierten Enzyme (Enzymderivate), die bezogen auf ihre jeweiligen technischen Einsatzgebiete, in ihren biochemischen und anwendungstechnischen Eigenschaften verbessert sind, wobei sich diese chemisch modifizierten Enzyme dadurch auszeichnen, daß sie an wenigstens einer der nicht im Aktivitätszentrum befindlichen, freien primären Aminogruppen des zugrundeliegenden Enzyms mit einem Rest der Formel A



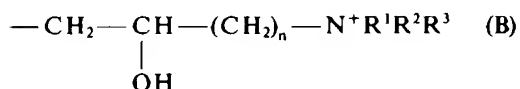
worin R für einen kationischen, amphiphilen, anionischen oder hydrophoben organischen Rest steht, substituiert sind. Zweckmäßige erfindungsgemäße Enzymderivate zeichnen sich dadurch aus, daß das zugrundeliegende Enzym eine Protease, Amylase, Glucoseisomerase oder Lipase ist. Das zugrundeliegende Enzym kann aber auch ein anderes, z. B. eine Pectinase, Cellulase oder Hemicellulase etc. sein.

In einer Variante der erfindungsgemäß chemisch modifizierten Enzyme zeichnen sich diese dadurch aus, daß

sie mit einem Rest der Formel A substituiert sind, in denen R für einen kationischen Rest der Formel

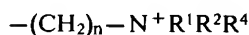


- steht, worin  $R^1$ ,  $R^2$  und/oder  $R^3$  für einen Niedrigalkylrest mit 1 bis 2 C-Atomen, vorzugsweise für Methyl, stehen und n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet. Bei bevorzugten chemisch modifizierten Enzymen dieser Variante der Erfindung sind die zugrundeliegenden Enzyme Proteasen, wie sie insbesondere für Wasch- und Reinigungszusammensetzungen verwendet werden. Besonders bevorzugt sind aber solche wasserlöslichen, chemisch modifizierten Proteasen (Proteasederivate), deren zugrundeliegende Protease eine alkalische oder hochalkalische Protease ist. Diese alkalischen oder hochalkalischen Proteasen können beispielsweise durch Kultivierung von Bacillus-Stämmen, wie z. B. *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens* oder *Bacillus licheniformis* etc., gewonnen werden. In der bevorzugten Ausgestaltung dieser Variante der Erfindung liegen daher Enzymderivate vor, die sich dadurch auszeichnen, daß sie wasserlösliche bzw. nicht wasserunlösliche, chemisch modifizierte Proteasen sind, die an wenigstens einer der nicht im Aktivitätszentrum befindlichen, freien primären Aminogruppen der zugrundeliegenden Protease mit einem kationischen organischen Rest der Formel B



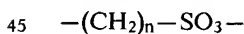
- worin  $R^1$ ,  $R^2$  und/oder  $R^3$  für einen Niedrigalkylrest mit 1 bis 2 C-Atomen, vorzugsweise für einen Methylrest, stehen und n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet, substituiert sind. Durch diese kationische Modifizierung von Proteasen werden Proteasederivate erhalten, bei denen die positiv geladenen  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins durch quartäre Ammoniumgruppen ersetzt sind. Der pK-Wert (und auch der isoelektrische Punkt) ist hierdurch erhöht. Insbesondere stark kationisch modifizierte Proteasen (Anteil von Mehrfachmodifizierung) zeigen eine etwas erhöhte Temperaturstabilität. Ferner ist beispielsweise die Waschwirkung der modifizierten hochalkalischen Proteasen nicht so stark von der Waschmitteldosierung abhängig wie die zugrundeliegenden nichtmodifizierten Proteasen. Solche chemisch modifizierten Proteasen sind insbesondere für die gewerbliche Wäscherei vorteilhaft verwendbar, wo häufig sehr hohe Waschflotten-pH-Werte vorliegen. Unter solchen Bedingungen sind kationisch modifizierte hochalkalische Proteasen den zugrundeliegenden nichtmodifizierten Proteasen deutlich überlegen. Kationisch modifizierte Proteasen zeigen auch bessere Abbaubarkeit von Eiweißen in Flecken.

- In einer anderen Variante der erfindungsgemäßen Enzymderivate zeichnen sich diese dadurch aus, daß sie mit einem Rest der Formel A substituiert sind, in dem R für einen amphiphilen Rest der Formel

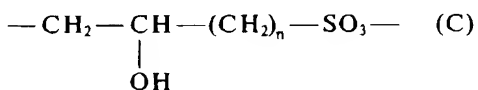


- steht, worin  $R^1$  und/oder  $R^2$  für einen Niedrigalkylrest mit 1 bis 2 C-Atomen, vorzugsweise für einen Methylrest, stehen,  $R^4$  für einen geradkettigen C10- bis C18-Alkylrest steht und n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet. Es liegen chemisch modifizierte Enzyme mit amphiphilem Charakter vor.

In einer weiteren Variante der erfindungsgemäß chemisch modifizierten Enzyme zeichnen sich diese dadurch aus, daß sie mit einem Rest der Formel A substituiert sind, in dem R für einen anionischen Rest der Formel

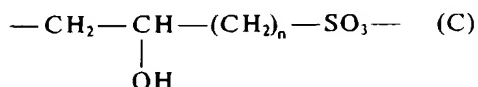


- steht, worin n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet. Bei einer Gruppe zweckmäßiger, chemisch modifizierter Enzyme dieser Variante der Erfindung sind die zugrundeliegenden Enzyme Proteasen, insbesondere alkalische oder hochalkalische Proteasen für Wasch- und Reinigungszusammensetzungen, wie sie weiter oben bereits näher beschrieben worden sind. In einer bevorzugten Ausgestaltung dieser Variante der Erfindung liegen daher wasserlösliche bzw. nicht wasserunlösliche, chemisch modifizierte Enzyme vor, die sich dadurch auszeichnen, daß sie chemisch modifizierte Proteasen, insbesondere chemisch modifizierte alkalische oder hochalkalische Proteasen, sind, die an wenigstens einer der nicht im Aktivitätszentrum befindlichen, freien primären Aminogruppen der zugrundeliegenden Protease mit einem anionischen organischen Rest der Formel C



- worin n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet, substituiert sind. In einer anderen Gruppe zweckmäßiger, chemisch modifizierter Enzyme der Erfindungsvariante mit anionischer Modifizierung des zugrundeliegenden Enzyms ist das zugrundeliegende Enzym eine  $\alpha$ -Amylase. Die zugrundeliegenden  $\alpha$ -Amylasen sind hierbei insbesondere solche, wie sie für Wasch- und Reinigungszusammensetzungen bzw. andererseits z. B. auch für die Stärkeverzuckerung eingesetzt werden. Besonders bevorzugt ist hierbei thermostabile  $\alpha$ -Amylase, wie sie z. B. aus *Bacillus licheniformis* gewonnen werden kann. In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung der Erfindungsvariante mit anionischer Modifizierung von Enzymen liegen daher wasserlösliche bzw. nicht wasserunlösliche, chemisch modifizierte Enzymderivate vor, die sich dadurch auszeichnen, daß sie chemisch modifizierte  $\alpha$ -Amylasen

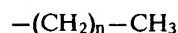
vorzugsweise chemisch modifizierte thermostabile  $\alpha$ -Amylasen, sind, die an wenigstens einer der nicht im Aktivitätszentrum befindlichen freien primären Aminogruppen der zugrundeliegenden Amylase mit einem anionischen Rest der Formel C



worin n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet, substituiert sind.

Die vorstehend beschriebenen, anionisch modifizierten Enzyme eignen sich insbesondere für Niedrig-pH-Waschmittelsysteme wie Flüssigvollwaschmittel und bestimmte Feinwaschmittel. Hier sind insbesondere die Enzymderivate aus milden alkalischen Proteasen (z. B. aus *Bacillus licheniformis* oder *Bacillus subtilis*) von Vorteil, insbesondere für bleichmittelfreie und weitgehend builderfreie Flüssigvollwaschmittel. Ferner erweist es sich hierbei als überaus vorteilhaft, daß die anionisch modifizierten Enzyme eine erhöhte Stabilität gegenüber üblichen Flüssigwaschmittelbestandteilen wie lineare Alkylsulfonate, Seifen, Paraffinsulfonaten, Fettsäureethoxysulfaten etc. aufweisen und auch in konzentrierten Flüssigwaschmitteln, insbesondere solchen mit hohem Wassergehalt und höheren pH-Werten, günstige Lagerstabilitäten aufweisen. Das pH-Optimum der anionisch modifizierten Enzyme ist im allgemeinen um 0,5 bis 1 pH-Einheit gegenüber dem zugrundeliegenden nichtmodifizierten Enzym zum sauren Bereich hin verschoben. Ein weiterer Effekt der anionischen Modifizierung ist die stark verbesserte Trubstabilität in Flüssigwaschmittelformulierungen (d. h. die Tendenz des im Flüssigwaschmittel gelösten Enzyms oder anderer darin gelöster Bestandteile der Enzympräparation während der Lagerung auszuflocken ist vermindert). Die vorstehend beschriebenen anionisch modifizierten Enzyme, insbesondere auch anionische  $\alpha$ -Amylasen, sind auch für den Einsatz in umweltfreundlichen enzymhaltigen Geschirrspülmitteln geeignet. Darüber hinaus besitzen z. B. anionisch modifizierte  $\alpha$ -Amylasederivate im tiefen pH-Bereich von 5,0 bis 6,0 bei höheren Temperaturen (70°C) eine erhöhte Stabilität im Vergleich zu den zugrundeliegenden nichtmodifizierten  $\alpha$ -Amylasen.

Eine weitere Variante der erfindungsgemäß chemisch modifizieren Enzyme zeichnet sich dadurch aus, daß das zugrundeliegende Enzym mit einem Rest der Formel A substituiert ist, in dem R für einen hydrophoben organischen Rest der Formel



worin n eine ganze Zahl von 1 bis 17 bedeutet, substituiert sind. Es liegen modifizierte Enzyme mit hydrophobem Charakter vor.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter erläutern, ohne sie jedoch in ihrem Umfang zu beschränken.

#### Beispiel 1

In einem Vorlagebehälter wurde zunächst manuell eine Gesamtmenge von 40 kg eines wäßrigen Enzymkonzentrates der folgenden Zusammensetzung

|                    |  |
|--------------------|--|
| Enzym              | Hochalkalische Protease aus <i>Bacillus alcalophilus</i> |
| Protein (Biuret):  | 15,1 Gew.-%  |
| Trockensubstanz:   | 32,2 Gew.-%  |
| Wasser:            | 67,8 Gew.-%  |
| Aktivität (DU/g*): | 600 000  |

[\*] 1000 Delft Units (DU) ist die proteolytische Aktivität, die bei einem Volumen von 1 ml einer 2gew.-%igen Enzymlösung nach Abbau von Casein eine Extinktionsdifferenz von 0,400 ergibt; 1 cm Lichtweg, 275 nm; Bestimmung gegen Blindprobenest]

mit Natronlauge auf einen pH 10 eingestellt und bei Umgebungstemperatur (ca. 20°C) mit etwa 2 kg (= 3,5 Gew.-% Aktivsubstanz bezogen auf das im eingesetzten Enzymflüssigkonzentrat enthaltene Enzym) einer 70 bis 71gew.-%igen wäßrigen Lösung von 2,3-Epoxypropyl-trimethylammoniumchlorid (kommerziell verfügbares Flüssigpräparat) vermischt. Die erhaltene Mischung wurde mittels einer Pumpe in einen 50 l Rührreaktor überführt und durch Plattenwärmetauscher auf eine Eingangstemperatur von 30°C erwärmt.

Der Reaktionsverlauf wurde zur Quantifizierung und Detektion der chemisch modifizierten Proteasen durch Kationenaustauschchromatographie (Ultropak TSK CM-2-SW 250  $\times$  4,6 mm = Kationenaustauscher auf Carboxymethylbasis der Firma Pharmacia LKB GmbH, Freiburg) verfolgt. Als Starteluens wurde 0,05 molarer Natriumacetatpuffer mit pH 6,0 verwendet. Eluiert wurde durch Zugabe eines 0,4 molaren Natriumacetatpuffers mit ebenfalls pH 6,0. Die Ergebnisse des Reaktionsverlaufes sind nachfolgend in Abhängigkeit von der Reaktionszeit zusammengestellt. Der Modifizierungsgrad bezieht sich hierbei auf die zugrundeliegende Protease (native Protease), wobei Mehrfachsubstitutionen unberücksichtigt bleiben, und ist als das relative Verhältnis der Konzentration der Enzymderivate zu der Summe der Konzentrationen des nativen Enzyms und der Enzymderivate definiert. Der Modifizierungsgrad wird in Prozent angegeben und ein Modifizierungsgrad von 100% ist somit gleichbedeutend mit der Abwesenheit von nativem Enzym. Die in % angegebene Aktivität ist volumen-

korrigiert und bezieht sich auf die eingesetzte Aktivität (Delft Units) des nativen Enzyms.

5

10

| Zeit<br>(h) | Modifizierungsgrad<br>(%) | Aktivität<br>(%) |
|-------------|---------------------------|------------------|
| (0)*)       | 40                        | 95               |
| 1           | 76                        | 94               |
| 3           | 96                        | 95               |
| 4           | 97                        | 93               |

\*) Befüllen des Reaktors

15

Die Reaktion verlief exotherm, wodurch sich die eingangs eingestellte Temperatur von 30°C auf ca. 33 bis 35°C erhöhte. Nach 4 h wurde die Reaktion durch Abkühlung des Reaktionsgemisches auf 20°C (Plattenwärmetauscher) und durch Zugabe wäßriger 20gew.-%iger Zitronensäure unter Einstellung eines pH-Wertes von 7 gestoppt.

20

Die Isolierung der wasserlöslichen, chemisch modifizierten Protease erfolgte nach an sich für die Isolierung von Enzymen bekannten Methoden, wie Ionenaustauschchromatographie.

Das erhaltene Produkt konnte ohne Schwierigkeiten durch an sich bekannte Maßnahmen, wie Extrusion oder Sprühtrocknung, in ein Enzymgranulat überführt werden.

Man erhielt 80 kg einer chemisch durch Substitution mit 3-Trimethylammonium-2-hydroxypropyl-Resten modifizierten hochalkalischen *Bacillus alcalophilus*-Protease in Granulatform. Die Eigenschaften des erhaltenen Proteasederivatgranulates sind nachfolgend zusammengestellt.

25

|                                    |            |       |      |      |
|------------------------------------|------------|-------|------|------|
| Gehalt an unmodifizierter Protease | < 5 Gew.-% |       |      |      |
| Mehrfachsubstitution               | gering     |       |      |      |
| Aktivität (%)*)                    | 100        | 104,5 | 107  | 107  |
| pH-Wert                            | 10,0       | 10,5  | 11,0 | 11,5 |

30

[\*] Bezogen auf Aktivität der nativen Protease (Delft Units) = 100%; hochmolekulares Substrat: Casein; 40°C, 40 min.; gemittelte Werte aus verschiedenen Messungen.]

35

Das Temperaturprofil der chemisch modifizierten Protease (d. h. die Aktivität in % in Abhängigkeit von der Temperatur) zeigte im wesentlichen denselben Verlauf wie das Temperaturprofil für die native Protease (jeweils 20 Minuten, pH 8, Substrat = Acetylcasein, Temperaturbereich 40 bis 70°C). Die Ergebnisse zeigen, daß das aktive Zentrum der chemisch modifizierten hochalkalischen Protease aus *Bacillus alcalophilus* nicht durch das milde chemische Modifizierungsverfahren beeinträchtigt worden ist.

40

Analoge Modifizierungen mit weiteren Konzentraten der hochalkalischen Protease aus *Bacillus alcalophilus* zeigten, daß gegebenenfalls bei der Konzentratherstellung auftretende Schwankungen in der Zusammensetzung praktisch keinen Einfluß auf die Modifizierungsrate, die Modifizierungsgeschwindigkeit und die Produktidentität ausübten. Die Proteaseeigenschaften wurden durch die milde chemische Modifizierung nicht negativ beeinflusst. Die Auswirkungen der stärkeren Kationisierung der chemisch modifizierten Proteasederivate gegenüber der nativen Protease zeigen sich über Sekundäreffekte in den weiter unten beschriebenen anwendungstechnisch zu beobachtenden Phänomenen.

45

#### Beispiel 2

50

Analog zu Beispiel 1 wurde ein wäßriges Enzymkonzentrat der folgenden Zusammensetzung

55

|                   |   |
|-------------------|---|
| Enzym:            | Alkalische Protease aus <i>Bacillus licheniformis</i> |
| Trockensubstanz:  | 22,4 Gew.-%   |
| Wasser:           | 77,6 Gew.-%   |
| Aktivität (DU/g): | 921 000   |

60

mit Natronlauge auf einen pH 10 eingestellt und bei Umgebungstemperatur (ca. 20°C) mit einer solchen Menge einer 70 bis 71gew.-%igen wäßrigen Lösung von 2,3-Epoxypropyltrimethylammoniumchlorid vermischt, die einer Menge von 5 Gew.-% Aktivsubstanz (= Modifizierungsreagenz) bezogen auf die eingesetzte Enzymmenge entsprach. Die Reagenzzugabe erfolgte innerhalb von 5 Minuten. Das Gemisch wurde auf 25°C erwärmt und der Reaktionsverlauf analog zu Beispiel 1 durch Ionenaustauschchromatographie verfolgt. Die Ergebnisse des Reaktionsverlaufes sind nachfolgend in Abhängigkeit von der Reaktionszeit zusammengestellt. Der Modifizierungsgrad ist hierbei wie in Beispiel 1 definiert, die Aktivität in Prozent (analog Beispiel 1) ebenfalls volumenkorrigiert und bezieht sich auf die eingesetzte Aktivität (Delft Units) der nativen Protease.

65



| Zeit<br>(h) | Modifizierungsrate<br>(%) | Aktivität*)<br>(%) |
|-------------|---------------------------|--------------------|
| 0           | 0                         | 97                 |
| 1           | 40                        | 94,5               |
| 2           | 85                        | 88                 |
| 3           | 93                        | 82                 |
| 4           | 98                        | 83,5               |

\*) siehe Beispiel 1

Nach 4 Stunden wurde das Reaktionsgemisch abgekühlt und durch Zugabe wäßriger 20gew.-%iger Zitronensäure unter Einstellung eines pH = 7 gestoppt.

Der leichte Aktivitätsabfall der chemisch modifizierten Protease im Vergleich zur nativen Protease ist hier auf eine höhere Alkalilabilität der eingesetzten alkalischen *Bacillus licheniformis*-Protease zurückzuführen. Analoge Modifizierungen mit weiteren *Bacillus licheniformis*-Protease-Konzentraten zeigten, daß sich dieser Aktivitätsabfall bei Verwendung von Propandiol-haltigen Protease-Konzentraten vermeiden läßt. Propandiol-stabilisierte Protease-Konzentrate lassen sich nahezu verlustfrei modifizieren. Das flüssige Endprodukt dieses Beispiels wurde direkt für weitere Versuche verwendet.

### Beispiel 3

Analog zu den vorhergehenden Beispielen wurde ein wäßriges Enzymkonzentrat der in Beispiel 1 angegebenen Zusammensetzung (hochalkalische Protease aus *Bacillus alcalophilus*) mit 3-Chloro-2-hydroxydimethylco(C12—C16)ammoniumchlorid umgesetzt und der Reaktionsverlauf analog zu Beispiel 1 durch Kationenaustauschchromatographie verfolgt. Die Konzentration der Protease war so eingestellt, daß eine Aktivität von 200 kDU/ml im Reaktionsgemisch vorlag. Das als chemisches Modifizierungsreagenz verwendete Chlorhydrin wurde in Form der verdünnten, kommerziell verfügbaren Lösung (Firma Degussa) verwendet und in einer Menge eingesetzt, daß 2 Gew.-% Aktivsubstanz bezogen auf das eingesetzte Enzym vorlagen. Die Umsetzung wurde bei 30°C durchgeführt und der pH-Wert zur Aktivierung und Überführung des Chlorhydrins in das Epoxid konstant auf pH 11 eingestellt (Abfangen des freigesetzten Chlorwasserstoffes). Nachfolgend ist der erreichte Modifizierungsgrad in Abhängigkeit von der Reaktionszeit zusammengestellt.

|                        |   |    |    |    |    |
|------------------------|---|----|----|----|----|
| Modifizierungsgrad ( ) | 0 | 60 | 81 | 89 | 98 |
| Zeit (h)               | 0 | 1  | 2  | 3  | 4  |

### Beispiel 4

Es wurden jeweils 0,8 kg wäßriges Enzymkonzentrat der hochalkalische Protease aus *Bacillus alcalophilus* mit einem Propandiol-Gehalt von 40 Gew.-% und folgender weiterer Zusammensetzung

|                         |                                     |
|-------------------------|-------------------------------------|
| Protein (Biuret):       | 6 Gew.-%                            |
| Anorganische Salze:     | 3 Gew.-% (z. B. CaCl <sub>2</sub> ) |
| Nichtenzymbestandteile: | 1 Gew.-%                            |
| Wasser:                 | 50 Gew.-%                           |

unter Einstellung eines Anfangs-pH-Wertes von 12 bis 30°C unter verschiedenen, weiter unten angegebenen Reaktionsbedingungen mit Natrium-3-Chloro-2-hydroxypropylsulfonat (festes Reagenz der Firma Shell Chemie) umgesetzt.

Der Anfangs-pH-Wert fiel nach Reaktionsbeginn auf Grund der Aktivierung des eingesetzten Chlorhydrins zum Epoxid unter gleichzeitiger Bildung von Chlorwasserstoff innerhalb kurzer Zeit auf pH 11 und wurde durch kontinuierliche Zugabe von 4 N Natronlauge auf den jeweils gewünschten pH-Wert von 11 bis 12 eingestellt. Die Bildung des aktiven Reagenzes (d. h. des Epoxides) — und damit auch der Reaktionsverlauf — konnte leicht anhand des Verbrauchs an Natronlauge verfolgt werden. Der Reaktionsverlauf unter Bildung von schwach bis mittelstark anionisch modifizierten Enzymderivaten (d. h. bei Umsetzungen mit bis zu 5 Gew.-% Reagenz bezogen auf eingesetztes Enzym) konnte auch analog zu Beispiel 1 mittels Kationenaustauschchromatographie (Ultropak TSK-2-CM 250 × 4,6 mm, pH = 6) verfolgt werden. Durch höhere Reagenzkonzentrationen von 5 bis 10 Gew.-% (bezogen auf das eingesetzte Enzym) war es möglich, die eingesetzte hochalkalische Protease aus *Bacillus alcalophilus* auch mehrfach zu modifizieren (d. h. die Zahl der in ein Proteasemolekül, eingeführten Substituenten war > 1).

Zur Beendigung der Reaktion wurde das jeweilige Reaktionsgemisch auf 20°C abgekühlt und mit wäßriger 20gew.-%iger Zitronensäure auf pH 7 neutralisiert.

Die Isolierung/Aufkonzentrierung der chemisch modifizierten Proteasen erfolgte nach an sich für die Isolierung von Enzymen bekannten Methoden, wie Ionenaustauschchromatographie.

Hierbei wurden je nach den eingestellten Bedingungen wasserlösliche, chemisch modifizierte Enzymderivate mit mittelstarkem bis starkem Modifizierungsgrad erhalten.

| Nr. | Reagenz<br>(Gew.-%) | Reaktionszeit<br>(h) | pH    | Modifizierungsgrad |
|-----|---------------------|----------------------|-------|--------------------|
| 4a  | 5                   | 4                    | 11    | mittelstark        |
| 4b  | 3,1                 | 8                    | 11—12 | mittelstark        |
| 4c  | 2 × 5               | 6                    | 11    | stark              |

10 Für die anwendungstechnischen Versuche wurden die anionisch modifizierten Enzyme in Form einer mit 40 Gew.-% Propandiol stabilisierten Lösung verwendet.

#### Beispiel 5

15 Analog zu Beispiel 4 wurden alkalische Proteasen aus *Bacillus licheniformis* in unterschiedlicher, Form — Propandiol-haltiges Verdampferkonzentrat zur Herstellung der alkalischen Protease (P1), reguläre Produktlösung der alkalischen Protease (P2) bzw. Konzentrat der alkalischen Protease mit einer Aktivität von 750 000 DU/g — mit Natrium-3-Chloro-2-hydroxypropylsulfonat unter den folgend angegebenen Reaktionsbedingungen umgesetzt. Hierbei wurden je nach den eingestellten Reaktionsbedingungen chemisch modifizierte Enzym-  
 20 derivate mit mittlerem bis starkem Modifizierungsgrad erhalten.

| Nr. | Enzym | Reagenz<br>(Gew.-%) | Reaktionszeit<br>(h) | pH      | Modifizierungs-<br>grad |
|-----|-------|---------------------|----------------------|---------|-------------------------|
| 5a  | P1    | 1                   | 6                    | 11      | mittel                  |
| 5b  | P3    | 3,1                 | 8                    | 11—11,5 | mittel                  |
| 5c  | P1    | 2                   | 4                    | 10—12   | mittel                  |
| 5d  | P3    | 1                   | 8                    | 11      | mittel                  |
| 5e  | P2    | 1,5                 | 8                    | 11      | mittel                  |
| 5f  | P2    | 5                   | 4                    | 11      | stark                   |

35 Die erhaltenen modifizierten Proteasen dieses Beispiels weisen Aktivitäten von über 90% der Ausgangsaktivität (Aktivität der eingesetzten Protease) auf.

#### Beispiel 6

40 Analog zu Beispiel 4 wurde eine *Bacillus subtilis*-Protease mit Natrium-3-Chloro-2-hydroxypropylsulfonat unter folgenden Bedingungen umgesetzt.

|                |   |
|----------------|---|
| Enzym:         | 38 g Protease-Pulver  |
| Propandiol:    | 220 g   |
| Wasser:        | 180 g   |
| 45 Aktivität:  | 71 000 DU/g (nach Verdünnung der Protease mit Propandiol und Wasser gemäß den vorstehenden Angaben) |
| Reagenz:       | 8 g   |
| 50 pH-Wert:    | 11  |
| Temperatur:    | 30°C  |
| Reaktionszeit: | 4 h   |

55 Der Reaktionsverlauf wurde mittels Kationenaustauschchromatographie (Ultropak TSK-2-CM, pH = 5,2) verfolgt. Der Abbruch der Reaktion erfolgte wie im Beispiel 4 angegeben durch Abkühlung auf 20°C und Zugabe von 20gew.-%iger Zitronensäure zur Einstellung des pH-Wertes auf 7.

Man erhielt wasserlösliche, anionisch modifizierte Proteasen mit mittlerem Modifizierungsgrad, deren Aktivität über 93% der Ausgangsaktivität (Aktivität der eingesetzten Protease) lag.

#### Beispiel 7

60 Ein wäßriges Enzymkonzentrat aus hochalkalischen Protease aus *Bacillus alcalophilus* wurde unter intensivem Rühren und unter Zusatz einer stabilisierenden und lösungsvermittelnden Menge von Propandiol unter nachfolgenden Bedingungen mit Decen-1-oxid (Firma Peroxid-Chemie) umgesetzt.

65

|                     |                                       |   |
|---------------------|---------------------------------------|---|
| Proteasekonzentrat: | 15 Gew.-%                             |   |
| Propandiol:         | 81 Gew.-%                             |   |
| Reagenz:            | 2 Gew.-% zu Beginn der Reaktion (0 h) |   |
|                     | 2 Gew.-% nach 3 h                     |   |
| pH-Wert:            | 11                                    | 5 |
| Temperatur:         | 30°C                                  |   |

Der Reaktionsverlauf konnte durch Kationenaustauschchromatographie (Ultropak TSK-CM-2SW 250 × 4,6 mm) verfolgt werden. Die Reaktion wurde nach 22 h wie üblich durch Abkühlen und pH-Wert-Einstellung mittels 20gew.-%iger Zitronensäure auf pH 7 gestoppt und das gebildete Produkt mit deutlichem Anteil an hydrophoben Proteasederivaten mit mittlerem Modifizierungsgrad durch Gelfiltration (G 25-Medium; PD 10-Säulen der Firma Pharmacia LKB GmbH, Freiburg) gereinigt und durch Umkehr-Chromatographie (reversed phase) wie folgt analysiert.

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Säule:     | Waters Nova Pak C18 (150 × 4,6 mm; Firma Millipore GmbH, Eschborn)                    | 15 |
| Solvent A: | 0,1gew.-%ige wäßrige Trifluoressigsäure-Lösung  |    |
| Solvent B: | 0,1gew.-%ige wäßrige Trifluoressigsäure-Lösung/Acetonitril im Volumenverhältnis 40/60 | 20 |
| Gradient:  | von 5 bis 55 min., von 0% auf 100% Solvent B  |    |
| Detektion: | UV-Licht bei 280 nm   |    |

#### Beispiel 8

Analog zu Beispiel 2 wurde ein wäßriges Standardamylasekonzentrat der folgenden Zusammensetzung:

|                      |   |    |
|----------------------|---|----|
| Enzym:               | Thermostabile $\alpha$ -Amylase aus <i>Bacillus licheniformis</i> |    |
| Protein (Biuret):    | 5 Gew.-%  |    |
| Anorganische Salze:  | 3 Gew.-% (z. B. $\text{CaCl}_2$ )                                 | 30 |
| Dextrine:            | 5 Gew.-%  |    |
| Wasser:              | 87 Gew.-%   |    |
| Aktivität (MWU/g)*): | 820 000   |    |

[\*) 1 Modifizierte Wohlgemuth Einheit (MWU) ist die Enzymmenge, welche 1 mg lösliche Stärke in 30 Minuten zu einem Dextrin definierter Größe abbaut; 40°C; die Größe des gebildeten Dextrins wird durch die Farbe eines Dextrin-Jod-Komplexes angezeigt.]

mit Natronlauge auf einen pH 10 eingestellt und bei Umgebungstemperatur (20°C) mit einer solchen Menge einer 70 bis 71gew.-%igen wäßrigen Lösung von 2,3-Epoxypropyltrimethylammoniumchlorid vermischt, die einer Menge von 5 Gew.-% Aktivsubstanz bezogen auf die eingesetzte Enzymmenge entsprach. Das Gemisch wurde auf 26°C erwärmt und der Reaktionsverlauf analog zu Beispiel 1 durch Kationenaustauschchromatographie (Ultropak TSK-CM-2SW 250 × 4,6 mm; pH 5,2) verfolgt.

Die Reaktion konnte nach 1 Stunde durch Abkühlung auf 20°C und Zugabe von wäßriger 20gew.-%iger Zitronensäure unter Einstellung eines pH-Wertes von 7 gestoppt werden. Das auf pH 7 korrigierte und mit Propandiol (Menge 50 Gew.-% bezogen auf die fertige Formulierung) stabilisierte, flüssige Endprodukt wurde direkt für weitere Versuche verwendet.

Das Temperatur- und das pH-Aktivitätsprofil des Produktes unterschied sich bei Verwendung unlöslicher Substrate (Phadebas = blaugefärbtes Stärkopolymer der Firma Pharmacia LKB GmbH, Freiburg) zur Aktivitätsbestimmung nur unwesentlich vom Temperatur- bzw. pH-Aktivitätsprofil der zugrundeliegenden, nichtmodifizierten  $\alpha$ -Amylase; diese Ergebnisse zeigen, daß durch das milde chemische Modifizierungsverfahren diese beiden wesentlichen und im zugrundeliegenden, nichtmodifizierten Enzym bereits hervorragenden Charakteristika kaum beeinträchtigt worden sind.

#### Beispiel 9

Analog zum Beispiel 5 wurde ein wäßriges Enzymkonzentrat der thermostabilen  $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus licheniformis* unter Zusatz einer stabilisierenden Menge von 50 Gew.-% Propandiol zum Enzymkonzentrat (bezogen auf den Gesamtansatz) und unter kontinuierlicher Zugabe von 10gew.-%iger Natronlauge bei einem konstanten pH-Wert von 11 mit Natrium-3-Chloro-2-hydroxypropylsulfonat (2,5 Gew.-% Aktivsubstanz bezogen auf die eingesetzte Enzymmenge) bei 30°C umgesetzt. Nach 2 Stunden hatten 84% und nach 4 Stunden 97% der eingesetzten Amylase reagiert. Zum Abbruch der Reaktion wurde auf 20°C abgekühlt und mit wäßriger 20gew.-%iger Zitronensäure auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Das flüssige Produkt der anionisch modifizierten Amylase wurde direkt für weitere Versuche verwendet.

Das pH-Aktivitätsprofil der wasserlöslichen, anionisch modifizierten Amylase wurde im Vergleich zum pH-Aktivitätsprofil der nativen Amylase durch das milde chemische Modifizierungsverfahren nicht beeinträchtigt bzw. es zeigt sogar einen leicht erhöhten Aktivitätsverlauf im pH-Bereich von 4 bis 5 (40°C, Substrat = lösliche Stärke, Aktivität in MWU). Bei höheren Temperaturen (70°C) weist das anionisch modifizierte Amylasederivat

bei pH-Werten im Bereich von 5,2 bis 5,6 deutlich erhöhte Stabilität im Vergleich zur nativen Amylase auf.

#### Beispiel 10

Reine Glucoseisomerase wurde mit 2,3-Epoxypropyl-trimethylammoniumchlorid chemisch modifiziert. Hierzu wurden Glucoseisomerase-Kristalle in Propandiol/Wasser gelöst und mit dem Reagenz (70 bis 71 gew.-%ige wäßrige Lösung von 2,3-Epoxypropyl-trimethylammoniumchlorid) unter nachfolgenden Bedingungen umgesetzt.

|                |  |
|----------------|--|
| Enzym:         | 160 g (38,4 Gew.-% Protein und 95 GIU/mg*)             |
| Propandiol:    | 400 g  |
| Wasser:        | 240 g  |
| Reagenz:       | 5 Gew.-% bezogen auf Gesamtansatz                      |
| Temperatur:    | 25° C  |
| Reaktionszeit: | 6 h  |
| pH-Wert:       | 10 bei 0 bis 5 h (1 N Natronlauge)<br>11 bei 5 bis 6 h |

[\*] 1 Glucoseisomerase Einheit (GIU) ist definiert als die Enzymmenge, die unter den folgenden Inkubationsbedingungen 1 mg Fructose bildet; Inkubationsbedingungen: 65° C, 1 h, Substrat aus 0,1 m Glucose in 0,05 m Phosphatpuffer, pH 8,0 mit 0,0004 m MgSO<sub>4</sub>]

Der Reaktionsverlauf konnte durch Anionenaustauschchromatographie (Ultropak DEAE-3-SW 150 × 4,6 mm, pH 5,8 = Säulenmaterial auf Diethylaminoethyl-Basis der Firma Pharmacia LKB GmbH, Freiburg; Starteluens 0,05 m NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Eluens 0,05 m NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/0,8 m Natriumchlorid) verfolgt werden.

Zur Beendigung der Reaktion wurde auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Im Verlaufe der Reaktion wurde kein Aktivitätsverlust gegenüber der eingesetzten Aktivität des nichtmodifizierten Enzyms beobachtet. Dieses zeigt wiederum, daß das milde chemische Modifizierungsverfahren für die eingesetzten Glucoseisomerasen sehr gut verträglich ist.

#### Beispiel 11

Analog zu Beispiel 10 wurde reine Glucoseisomerase mit Natrium-3-chloro-2-hydroxypropylsulfonat umgesetzt, wobei jedoch der pH-Wert konstant auf pH 11 gehalten wurde. Auch hier wurde kein Aktivitätsverlust für die chemisch modifizierte Glucoseisomerase gegenüber der nativen Glucoseisomerase beobachtet. Dieses zeigt, daß auch die milde anionische Modifizierung für die native Glucoseisomerase sehr gut verträglich ist. Das nach Abbruch der Reaktion auf pH 7 neutralisierte flüssige Endprodukt konnte direkt für weitere Versuche verwendet werden.

#### Beispiel 12

Zur Demonstration des Verhaltens der chemisch modifizierten Enzyme im Waschprozeß wurde die Waschleistung durch Waschversuche an Testgeweben in Laborwaschmaschinen (Typ: Linitest) bestimmt. Hierzu wurde Testgewebe mit standardisierten Waschmittelformulierungen gewaschen, die die zu testenden chemisch modifizierten Enzyme (Enzymderivate) bzw. in Vergleichsversuchen die nativen Enzyme enthielten. Die Versuche wurden bei den angegebenen pH-Werten und mit Wasser von 15° dH im jeweils angegebenen Temperaturbereich von 15 bis 60° C ausgeführt. Die Waschleistung wurde durch Messung der Aufhellung von angeschnitzten Testgeweben als Remissionsdifferenz (Remission des trockenen Testgewebes nach dem Waschversuch abzüglich der Remission des Testgewebes vor dem Waschversuch) ermittelt. Die größere Remissionsdifferenz gibt hierbei die bessere Waschleistung an. Die Durchführung der Waschversuche war wie folgt: Die enzymhaltige Waschmittellösung wirkte im rotierenden Probenbehälter auf das Testgewebe ein. Nach Beendigung des Waschvorganges wurde das Testgewebe zweimal mit Leitungswasser gespült und nach Bügeln die Aufhellung des Gewebes über die Remissionsmessung erfaßt.

|                 |   |
|-----------------|---|
| a) Bedingungen: | 6 g/l Waschmittel, 15—60° C, 45 Minuten, 15° dH.  |
| Testgewebe:     | EMPA 116 = Baumwolle, verschmutzt mit Blut, Milch und Tusche.   |
| Waschmittel:    | Handelsübliches Europäisches Pulvervollwaschmittel I, enthaltend 25 Gew.-% Zeolith, 10 Gew.-% Natriumcarbonat, 6,5 Gew.-% lineare Alkylsulfonate, 4,5 Gew.-% Seife, 2 Gew.-% Carboxymethylcellulose, 0,5 Gew.-% Phosphonate, 2,0 Gew.-% Magnesiumsilikat, 25 Gew.-% Natriumperborat, 1,5 Gew.-% Tetraacetylenlindiamin und Natriumsulfat ad 100 Gew.-%. |

Die Ergebnisse dieses Waschversuches sind in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben.

| Nr.*)  | Enzym bzw. Enzymderivat                                  | pH**) | Remissions-<br>differenz<br>(%) |
|--------|--|-------|---------------------------------|
| 12 a 1 | aus Beispiel 1   | 9     | 30                              |
| 12 a 2 | aus Beispiel 1   | 10    | 29                              |
| 12 a 3 | aus Beispiel 1   | 11    | 28                              |
| 12 a 4 | aus Beispiel 2   | 9     | 22                              |
| 12 a 5 | aus Beispiel 2   | 10    | 16                              |
| 12 V 1 | native alkalische Protease aus<br>Bacillus licheniformis | 9     | 19                              |
| 12 V 2 | native alkalische Protease aus<br>Bacillus licheniformis | 10    | 10                              |

\*) V = Vergleichsversuch

\*\*) pH gemessen vor dem Waschen

- b) Bedingungen: Europäisches handelsübliches Vollwaschmittel II, Eigen-pH-Wert, 15–60°C, 1 kDU/100 ml, 45 Minuten.
- Testgewebe: EMPA 117 = Baumwolle/Polyester-Mischgewebe, verschmutzt mit Blut, Milch und Tusche.

Es wurden die nachfolgenden Ergebnisse erhalten:

| Nr.    | Enzym bzw. Enzymderivat | Waschmittel-<br>dosierung<br>(g/l) | Remissions-<br>differenz<br>(%) |
|--------|-------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 12 b 1 | aus Beispiel 1          | 6                                  | 40                              |
| 12 b 2 | aus Beispiel 1          | 8                                  | 39                              |
| 12 b 3 | aus Beispiel 1          | 10                                 | 38                              |

Dieses Beispiel zeigt die geringe Abhängigkeit der kationisch modifizierten Protease aus Beispiel 1 von der Waschmitteldosierung. Demgegenüber wirkt sich die Waschmitteldosierung auf die native Protease wesentlich stärker aus.

- c) Bedingungen: 6 g/l Waschmittel, pH = 11,5, 15° dH, 15–60°C, 45 Minuten.
- Testgewebe: EMPA 117 = Baumwolle/Polyester-Mischgewebe, verschmutzt mit Blut, Milch und Tusche.
- Waschmittel: Zusammensetzung siehe unter a) dieses Beispiels.

Es wurden die nachfolgenden Ergebnisse erhalten:

| Nr.    | Enzym bzw. Enzymderivat | Enzymdosierung<br>(DU/100 ml) | Remissions-<br>differenz<br>(%) |
|--------|-------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 12 c 1 | aus Beispiel 1          | 250                           | 28                              |
| 12 c 2 | aus Beispiel 1          | 500                           | 33                              |
| 12 c 3 | aus Beispiel 1          | 750                           | 34                              |
| 12 c 4 | aus Beispiel 1          | 1000                          | 34                              |
| 12 c 5 | aus Beispiel 1          | 1500                          | 35                              |
| 12 c 6 | aus Beispiel 1          | 2000                          | 40                              |

Das in diesem Beispiel eingesetzte chemisch modifizierte Proteasederivat zeigt hervorragende Waschwirk-samkeit bei sehr hohen Waschflotten-pH-Werten. Dieses chemisch modifizierte Enzymderivat eignet sich daher insbesondere für die gewerbliche Wäscherei. Durch dieses kationisch modifizierte Proteasederivat werden insbesondere Proteine wie Ei-proteine sehr gut abgebaut.

- d) Bedingungen: 2 g/l Flüssigvollwaschmittel, 30° C, 30 Minuten, 15° dH, 0,5 kDU/100 ml.  
 Testgewebe: ox. EMPA 117 = Baumwolle/Polyester-Mischgewebe, verschmutzt mit Blut, Milch und Tusche; das Mischgewebe wurde vor dem Waschvorgang mit Perborat (2 g/l) bei pH 10 ohne Waschmittelzusatz vorbehandelt und danach einem Intensiv-Spülgang unterworfen; man erhielt so Testgewebe mit gealterten Verschmutzungen, die wesentlich empfindlicher auf Aktivitätsunterschiede der Enzyme und Enzymderivate in der Waschflotte reagieren.
- Waschmittel: Europäisches Flüssigvollwaschmittel, enthaltend 10,5 Gew.-% lineare Alkylsulfonate, 13 Gew.-% Natrium-Fettsäuresalz, 5 Gew.-% Alkylsulfat, 10,3 Gew.-% Fettalkoholethoxylat, 10 Gew.-% Triethanolamin; 47 Gew.-% flüchtige Anteile (Wasser, Propandiol).

Die Ergebnisse dieses Waschversuches sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt.

| Nr.*)   | Enzym bzw. Enzymderivat  | pH**) | Remissionsdifferenz (%) |
|---------|--|-------|-------------------------|
| 12 d 1  | aus Beispiel 5a  | 7     | 12,5                    |
| 12 d 2  | aus Beispiel 5a  | 8     | 17                      |
| 12 d 3  | aus Beispiel 5a  | 9     | 13                      |
| 12 d 4  | aus Beispiel 5a  | 10    | 5,5                     |
| 12 V 3  | native, alkalische, Protease<br>aus <i>Bacillus licheniformis</i>  | 7     | 10,5                    |
| 12 V 4  | native, alkalische, Protease<br>aus <i>Bacillus licheniformis</i>  | 8     | 15,5                    |
| 12 V 5  | native, alkalische, Protease<br>aus <i>Bacillus licheniformis</i>  | 9     | 16,5                    |
| 12 V 6  | native, alkalische, Protease<br>aus <i>Bacillus licheniformis</i>  | 10    | 12                      |
| 12 d 5  | aus Beispiel 4b  | 9,0   | 17,8                    |
| 12 d 6  | aus Beispiel 4b  | 9,5   | 20,1                    |
| 12 d 7  | aus Beispiel 4b  | 10,0  | 17,9                    |
| 12 d 8  | aus Beispiel 4b  | 10,5  | 14,3                    |
| 12 V 7  | native hochalkalische Protease<br>aus <i>Bacillus alcalophilus</i> | 9,0   | 12,2                    |
| 12 V 8  | native hochalkalische Protease<br>aus <i>Bacillus alcalophilus</i> | 9,5   | 16,2                    |
| 12 V 9  | native hochalkalische Protease<br>aus <i>Bacillus alcalophilus</i> | 10,0  | 19,4                    |
| 12 V 10 | native hochalkalische Protease<br>aus <i>Bacillus alcalophilus</i> | 10,5  | 22,5                    |

\*) V = Vergleichsversuch  
 \*\*) pH-Wert gemessen vor dem Waschen

Dieses Beispiel zeigt deutlich die Verschiebung des pH-Optimums um ca. 0,5 – 1 pH-Einheit für das chemisch, anionisch modifizierte Proteasederivat im Vergleich zur nativen Protease. Die anionische Modifizierung führt darüber hinaus zu einer stark verbesserten Trubstabilität in Flüssigvollwaschmittelformulierungen.

### Beispiel 13

Analog zur allgemeinen Arbeitsweise des Beispiels 12 wurden die anionisch modifizierten Enzymderivate auf ihre Stabilität gegenüber einzelnen Flüssigwaschmittelbestandteilen und gegenüber einer vollständigen Flüssigwaschmittelformulierung sowie auf ihre Lagerstabilität getestet.

a) Die Stabilität der anionisch modifizierten Enzymderivate gegenüber verschiedenen üblichen Bestandteilen von Flüssigwaschmitteln, wie lineare Alkylsulfonate (LAS), Seifen, Paraffinsulfonaten und Fettsäureethoxysulfaten (FAES), wurde unter folgenden Bedingungen bestimmt: 2,5 g/l des jeweiligen Flüssigwaschmittelbestandteiles, 40° C, Enzymderivat-Konzentration 4 kDU/ml, Zusatz von 100 ppm Calcium. Die hier gewählten Konzentrationen entsprechen in etwa denjenigen, wie sie in der Waschflotte vorliegen. Die anionisch modifizierten Enzymderivate zeigen hierbei im Vergleich zu den nativen Enzymen deutlich höhere Stabilitäten in Gegenwart der Flüssigwaschmittelbestandteile. Während es z. B. bei den nativen Proteasen zu einem rapiden Aktivitätsabfall in Gegenwart von anionischen Tensiden kommt, zeigen die mittelstark anionisch modifizierte Protease aus Beispiel 4b bzw. die stark anionisch modifizierte Protease aus Beispiel 4c erheblich bessere Stabilitäten gegenüber üblichen anionischen Tensiden. Anionisch modifi-

zierte Enzymderivate eignen sich aufgrund ihrer höheren Stabilität gegenüber Flüssigwaschmittelbestandteilen somit sehr gut für den Einsatz in solchen Flüssigwaschmitteln. Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

| Nr.  | Enzym bzw. Enzymderivat   | Flüssigwaschmittelbestandteil | pH  | relative Aktivität*) in % nach Minuten |     |     |    |     |
|------|---|-------------------------------|-----|--|-----|-----|----|-----|
|      |   |                               |     | 20                                     | 40  | 60  | 80 | 120 |
| 13a1 | aus Beispiel 4c   | LAS                           | 9,5 | 82                                     | 74  |     | 62 | 57  |
| 13a2 | aus Beispiel 4b   | LAS                           | 9,5 | 41                                     | 31  |     | 20 | 20  |
| 13V1 | native hochalkalische Protease aus <i>Bacillus alcalophilus</i> | LAS                           | 9,5 | 5                                      | 0   | 0   |    |     |
| 13a3 | aus Beispiel 5f   | LAS                           | 7,5 | 98                                     | 88  | 82  |    |     |
| 13a4 | aus Beispiel 5b   | LAS                           | 7,5 | 61                                     | 48  | 32  |    |     |
| 13V2 | native alkalische Protease aus <i>Bacillus licheniformis</i>    | LAS                           | 7,5 | 22                                     | 5   | 3   |    |     |
| 13a5 | aus Beispiel 4c   | Seife                         | 7,5 | 48                                     | 40  | 36  | 30 | 30  |
| 13a6 | aus Beispiel 4b   | Seife                         | 7,5 | 30                                     | 22  | 22  | 20 | 18  |
| 13V3 | wie 13V1  | Seife                         | 7,5 | 0                                      | 0   |     |    |     |
| 13a7 | aus Beispiel 4c   | Paraffinsulfonate             | 9,5 |  |     | 60  |    | 58  |
| 13a8 | aus Beispiel 4b   | Paraffinsulfonate             | 9,5 |  |     | 35  |    | 30  |
| 13V4 | wie 13V1  | Paraffinsulfonate             | 9,5 |  |     | 10  |    | 5   |
| 13a9 | aus Beispiel 4c   | FAES                          | 10  | 100                                    | 100 | 100 |    |     |
| 13V5 | wie 13V1  | FAES                          | 10  | 75                                     | 70  | 64  |    |     |

\*) bezogen auf ursprüngliche Aktivität des Enzyms bzw. Enzymderivates

b) Die Stabilität anionisch modifizierter Enzymderivate gegenüber den Inhaltsstoffen einer üblichen, vollständigen Flüssigwaschmittelformulierung mit folgender analytischer Zusammensetzung

|                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|
| Alkylbenzolsulfonat-Natrium: | 4,5 Gew.-%                   |
| Fettsäure/-salz:             | 35,3 Gew.-%                  |
| Fettalkoholethoxylat:        | 9 Gew.-%                     |
| Triethanolamin:              | 11,5 Gew.-%                  |
| Wasser:                      | 31 Gew.-%                    |
| (flüchtige Anteile insgesamt | 38 Gew.-%; Alkohole, Wasser) |

wurde unter folgenden Bedingungen getestet; 6 g/l Flüssigwaschmittelformulierung, pH = 9,5, 40°C, Enzymkonzentration 4 kDU/ml, 100 ppm Calcium-Gehalt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt:

| Nr.    | Enzym bzw. Enzymderivat   | relative Aktivität in % nach Minuten |     |     |     |     |     |     |
|--------|---|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|        |   | 0                                    | 20  | 40  | 60  | 100 | 120 | 180 |
| 13 b 1 | aus Beisp. 4b   | 100                                  | 105 | 103 | 103 | 102 | 103 | 97  |
| 13 b 2 | aus Beisp. 4c   | 100                                  | 100 | 97  | 100 | 97  | 97  | 97  |
| 13 V 6 | native hochalkalische Protease aus <i>Bacillus alcalophilus</i> | 100                                  | 93  | 90  | 86  | 83  | 78  | 68  |

Dieses Beispiel zeigt deutlich die höhere Stabilität der chemisch modifizierten Proteasen in Flüssigwaschmittelformulierungen.

c) Die Lagerstabilität einiger anionisch modifizierter Enzymderivate in konzentrierten Flüssigwaschmittelformulierungen wurden unter nachfolgenden Bedingungen getestet.

Flüssigwaschmittelformulierung mit einem Gehalt an:

- 10 Gew.-% lineare Alkylsulfonate
- 10 Gew.-% nichtionische Tenside
- 5 Gew.-% Ethanol
- 5 Gew.-% Propandiol
- 70 Gew.-% Wasser
- 100 ppm Calcium-Gehalt
- pH = 9m5

Lagertemperatur: 37°C

Es wurden die in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellten Ergebnisse erhalten.

| Nr.    | Enzym bzw. Enzymderivat   | relative Aktivität*) in %<br>nach Tagen |    |   |
|--------|---|---|----|---|
|        |   | 12                                      | 19 | 7 |
| 13 c 1 | aus Beispiel 5f   | 51                                      | 38 | 7 |
| 13 V 7 | native alkalische Protease aus <i>Bacillus licheniformis</i>    | 25                                      | 19 | 2 |
| 13 c 2 | aus Beispiel 4c   | 33                                      | 27 | 3 |
| 13 V 8 | native hochalkalische Protease aus <i>Bacillus alcalophilus</i> | 31                                      | 4  | 0 |

\*) bezogen auf ursprüngliche Aktivität des Enzyms bzw. Enzymderivates

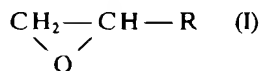
Dieses Beispiel zeigt die gute Stabilität anionisch modifizierter Proteasen in konzentrierten Flüssigwaschmitteln definierter Zusammensetzung und mit hohen Wassergehalten. Ähnlich gute Lagerstabilitäten waren auch mit der anionisch modifizierten Protease aus Beispiel 6 zu beobachten. Waschergebnisse mit den gelagerten Proben bestätigten die oben durch Aktivitätsmessungen gefundenen Unterschiede in den Lagerstabilitäten. Bei den nativen Enzymen war nach 50 Tagen Lagerung im Gegensatz zu den anionisch modifizierten Proteasen praktisch keine Waschwirkung mehr vorhanden.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur gezielten Veränderung der Eigenschaften eines Enzyms durch chemische Modifizierung, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das Enzym durch Umsetzung mit einer endständigen Epoxid- oder Halogenhydrinverbindung, die einen die biochemischen und anwendungstechnischen Eigenschaften gezielt verändernden, kationischen, amphiphilen, anionischen und/oder lipophilen bzw. hydrophoben organischen Rest enthält, in ein wasserlösliches bzw. nicht wasserunlösliches, chemisch modifiziertes Enzym (Enzymderivat) überführt.

2. Verfahren zur Herstellung wasserlöslicher bzw. nicht wasserunlöslicher, chemisch modifizierter Enzyme (Enzymderivate), **dadurch gekennzeichnet**, daß man durch unter basischen Bedingungen erfolgende Umsetzung wenigstens einer der nicht im Aktivitätszentrum befindlichen freien primären Aminogruppen eines Enzyms mit

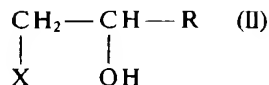
a) Epoxiden der Formel I



worin

R für einen kationischen, amphiphilen, anionischen oder lipophilen bzw. hydrophoben organischen Rest steht, oder mit

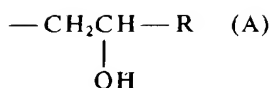
b) Halogenhydrinen der Formel II



worin

X für Halogen, vorzugsweise Chlor oder Brom, steht und R die obige Bedeutung besitzt, das Enzym in ein wasserlösliches bzw. nicht wasserunlösliches, chemisch modifiziertes Enzym (Enzymderivat) überführt, worin eine oder mehrere der genannten freien Aminogruppen des Enzyms mit einem Rest der Formel A





worin R die obige Bedeutung besitzt,  
substituiert sind

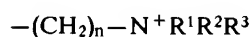
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß wäßrige Enzymkonzentrate mit 10 bis 35 Gew.-% Trockensubstanzgehalt eingesetzt werden.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung in Gegenwart von Enzymstabilisatoren und/oder Lösungsvermittlern, vorzugsweise in Gegenwart von Propandiol, durchgeführt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung bei pH-Werten von 9 bis 11 durchgeführt wird.

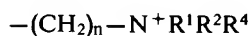
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung bei Temperaturen bis maximal 35°C, vorzugsweise bis maximal 30°C, durchgeführt wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß Epoxide der Formel I oder Halogenhydrine der Formel II eingesetzt werden, in denen R für einen kationischen organischen Rest der Formel



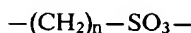
steht, worin R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und/oder R<sup>3</sup> für einen Niedrigalkylrest mit 1 bis 2 C-Atomen, vorzugsweise für Methyl, stehen und n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß Epoxide der Formel I oder Halogenhydrine der Formel II eingesetzt werden, in denen R für einen amphiphilen organischen Rest der Formel



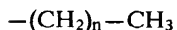
steht, worin R<sup>1</sup> und/oder R<sup>2</sup> für einen Niedrigalkylrest mit 1 bis 2 C-Atomen, vorzugsweise für Methyl, stehen, R<sup>4</sup> für einen geradkettigen C10- bis C18-Alkylrest steht und n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß Epoxide der Formel I oder Halogenhydrine der Formel II eingesetzt werden, in denen R für einen anionischen organischen Rest der Formel



steht, worin n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet.

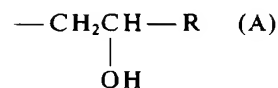
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß Epoxide der Formel I oder Halogenhydrine der Formel II eingesetzt werden, in denen R für einen organischen Rest der Formel



steht, worin n eine ganze Zahl von 1 bis 17 bedeutet.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Enzyme Proteasen, Amylasen, Glucoseisomerasen oder Lipasen eingesetzt werden.

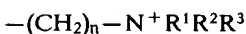
12. Wasserlösliche bzw. nicht wasserunlösliche, chemisch modifizierte Enzyme (Enzymderivate), dadurch gekennzeichnet, daß sie an wenigstens einer der nicht im Aktivitätszentrum befindlichen, freien primären Aminogruppen des zugrundeliegenden Enzyms mit einem Rest der Formel A



worin R für einen kationischen, amphiphilen, anionischen oder hydrophoben organischen Rest steht, substituiert sind.

13. Enzymderivate nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das zugrundeliegende Enzym, eine Protease, Amylase, Glucoseisomerase oder Lipase ist.

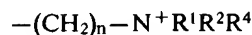
14. Enzymderivate nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das zugrundeliegende Enzym mit einem Rest der Formel A substituiert ist, worin R für einen kationischen organischen Rest der Formel



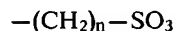
steht, worin R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und/oder R<sup>3</sup> für einen Niedrigalkylrest mit 1 bis 2 C-Atomen, vorzugsweise für Methyl, stehen und n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet.

15. Enzymderivate nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das zugrundeliegende Enzym mit einem

Rest der Formel A substituiert ist, worin R für einen amphiphilen organischen Rest der Formel

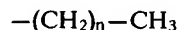


steht, worin  $\text{R}^1$  und/oder  $\text{R}^2$  für einen Niedrigalkylrest mit 1 bis 2 C-Atomen, vorzugsweise für Methyl, stehen,  $\text{R}^4$  für einen geradkettigen C10- bis C18-Alkylrest steht und n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet.  
16. Enzymderivate nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das zugrundeliegende Enzym mit einem Rest der Formel A substituiert ist, worin R für einen anionischen organischen Rest der Formel



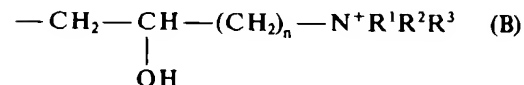
steht, worin n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet.

17. Enzymderivate nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das zugrundeliegende Enzym mit einem Rest der Formel A substituiert ist, worin R für einen organischen Rest der Formel



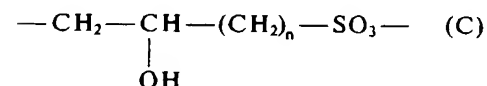
steht, worin n eine ganze Zahl von 1 bis 17 bedeutet.

18. Wasserlösliche bzw. nicht wasserunlösliche, chemisch modifizierte Proteasen, dadurch gekennzeichnet, daß sie die an wenigstens einer der nicht im Aktivitätszentrum befindlichen, freien primären Aminogruppen der zugrundeliegenden Protease mit einem kationischen organischen Rest der Formel B



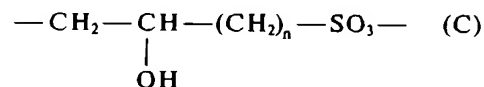
worin  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  und/oder  $\text{R}^3$  für einen Niedrigalkylrest mit 1 bis 2 C-Atomen, vorzugsweise für einen Methylrest, steht und n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet, substituiert sind.

19. Wasserlösliche bzw. nicht wasserunlösliche, chemisch modifizierte Proteasen, dadurch gekennzeichnet, daß sie an wenigstens einer der nicht in Aktivitätszentrum befindlichen, freien primären Aminogruppen der zugrundeliegenden Protease mit einem anionischen organischen Rest der Formel C



worin n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet, substituiert sind.

20. Wasserlösliche bzw. nicht wasserunlösliche, chemisch modifizierte  $\alpha$ -Amylase, dadurch gekennzeichnet, daß sie an wenigstens einer der nicht in Aktivitätszentrum befindlichen, freien primären Aminogruppen der zugrundeliegenden  $\alpha$ -Amylase mit einem anionischen organischen Rest der Formel C



worin n eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet, substituiert sind.